

УДК 543.94, 577.151.03

ВЛИЯНИЕ ПИЩЕВЫХ КОНСЕРВАНТОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ЭНДОПРОТЕАЗ

Хрунина М. А.

научный руководитель: канд. биол. наук Есимбекова Е. Н.

Сибирский федеральный университет

Пищевые консерванты являются неотъемлемым компонентом широкого спектра современных продуктов питания. Их действие направлено на предотвращение появления патогенных дрожжей, грибов, бактерий, тем самым существенно увеличивая срок хранения продуктов. Однако их присутствие в продуктах питания означает, что неизбежным является контакт пищевых консервантов с ферментами желудочно-кишечного тракта [1]. Цель нашего исследования: оценить воздействие пищевых консервантов на протеолитические ферменты поджелудочной железы человека. В задачи выполняемой работы входило:

1. Определить условия проведения анализов ферментативной активности в присутствии пищевых консервантов.
2. Сравнить степени воздействия пищевых консервантов на активность трипсина и химотрипсина.

Для проведения настоящего исследования были выбраны консерванты, наиболее часто используемые в пищевых продуктах: сорбиновая кислота (Е 200), сорбат калия (Е 202), бензоат натрия (Е 211) в концентрациях от 0,01 до 1 г/л.

Для определения действия консервантов на активность химотрипсина и трипсина использовали биolumинесцентный метод измерения активности протеолитических ферментов по константе спада биolumинесценции биферментной системы светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза [2]. Для этого в реакционную смесь вносили: 300 мкл 0,05 М калий фосфатного буфера pH 6,9; 5-7 мкл лиофилизированного препарата высокоочищенных ферментов, содержащий люциферазу из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* и NADH:FMN-оксидоредуктазу из *Vibrio fischeri*; 50 мкл 0,0025 % алифатического альдегида; 50 мкл 0,4 мМ раствора NADH; 50 мкл раствора анализируемого консерванта или 50 мкл дистиллированной воды в качестве контроля; 12 мкл раствора трипсина или химотрипсина и 10 мкл 0,5 мМ раствора FMN. Константу спада свечения рассчитывали по формуле $k_{сп} = (\ln(I_1/I_2))/\Delta t$, где I_1 – максимум интенсивности свечения системы, I_2 – интенсивность свечения системы через заданное время после достижения максимума, Δt – время (в минутах), за которое I_1 достигает I_2 . Об изменении активности протеаз судили по изменению константы спада свечения в присутствии дистиллированной воды ($k_{сп\text{ конт}}$) и анализируемого вещества ($k_{сп\text{ оп}}$). Относительную активность фермента рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{(k_{сп} - k_{сп\text{ фон}})}{k_{сп\text{ контр}}} \cdot 100\%$$

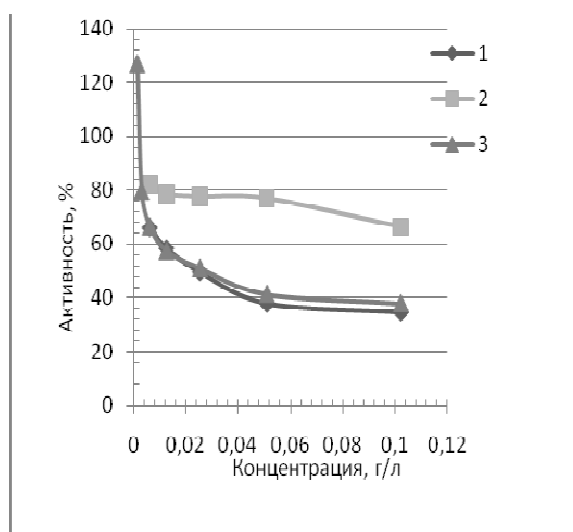
где $k_{сп\text{ фон}}$ – константа спада интенсивности свечения биферментной системы светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза в присутствии анализируемого консерванта, но без добавления в реакционную смесь протеолитических ферментов.

Степень воздействия консервантов на активность ферментов оценивали по величинам EC_{20} и EC_{50} , которые равны концентрации консерванта, вызывающей изменение параметра ферментативной реакции на 20 и 50 % соответственно.

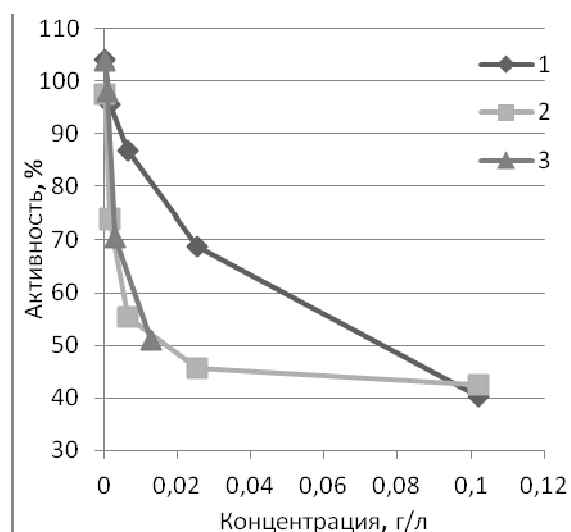
Регистрацию интенсивности свечения проводили на биOLUMинометре LUMAT LB 9507 (Berthold Technology, Германия).

Согласно принятым в Российской Федерации санитарно-эпидемиологическим правилам и нормативам, максимальный уровень содержания в продуктах бензойной и сорбиновой кислот, а также их солей, не должен превышать ~1 г/л [3].

Показано, что сорбиновая кислота в значительной степени ингибирует активность обеих исследуемых эндопротеаз (рис.1). Активность химотрипсина также в значительной степени ингибируется бензоатом натрия, а активность трипсина – сорбатом калия.



А)



Б)

Рисунок 1. Зависимость относительной активности химотрипсина (А) и трипсина (Б) от концентрации консерванта 1 – бензоата натрия, 2 – сорбата калия, 3 – сорбиновой кислоты.

Таблица 1. Значения EC_{50} и EC_{20} для бензоата натрия, сорбата калия и сорбиновой кислоты.

Консервант	Химотрипсин		Трипсин	
	EC_{20} , мг/л	EC_{50} , мг/л	EC_{20} , мг/л	EC_{50} , мг/л
Бензоат натрия	6	24	5	78
Сорбат калия	10	-	1	18
Сорбиновая кислота	3	27	2	13

Исследуемые ферменты секретируется в двенадцатиперстную кишку и, следовательно, имеют непосредственный контакт с пищей, а значит и с пищевыми консервантами в течение длительного времени [4]. Поэтому были проведены эксперименты определения изменения относительной активности химотрипсина от времени инкубирования фермента в водном растворе бензоата натрия, сорбата калия и сорбиновой кислоты в течение 1, 3 и 5 минут в концентрациях 0,25 г/л и 0,125 г/л (Рис. 2). Увеличение времени инкубации фермента с исследуемыми веществами приводит к уменьшению активности фермента.

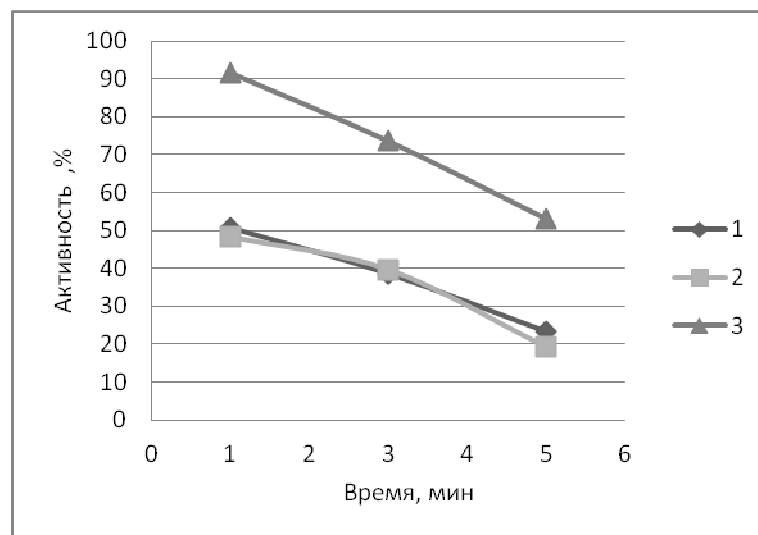


Рисунок 2. Зависимость активности химотрипсина от времени инкубации в растворе консерванта: 1 – бензоат натрия; 2 – сорбат калия; 3 – сорбиновая кислота.

Таким образом исследуемые консерванты оказывают сильный ингибирующий эффект на активность протеолитических ферментов человека. На примере химотрипсина показано, что ингибирующий эффект консервантов усиливается при увеличении времени контакта с ферментом.

Выражаю особую благодарность в выполнении данного эксперимента магистру Института Фундаментальной Биологии и Биотехнологии СФУ Асановой Анастасии Андреевне.

Список литературы

1. Ingram M., Kitchells A.G. Salt as a preservative for foods //J. Food Techol. 1967. N1
2. Петушков В.Н., Кратасюк Г.А., Фиш А.М., Гительзон И.И. Способ определения активности протеаз. //Авт.свид. N 1027615, опубл.07.07.83, Бюлл.N 25. С.159.
3. Сарафанова Л. А. Применение пищевых добавок. — СПб: ГИОРД, 1999. — 80 с.
4. Mu Y. Interaction of sodium benzoate with trypsin by spectroscopic techniques. Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy, Vol. 83 (1): 2011. 130-5.